

B2

New neurotropic growth factors comprising a homeobox peptide**Publication number:** FR2662698**Publication date:** 1991-12-06**Inventor:** JOLIOT ALAIN (FR); PROCHIAITZ ALAIN (FR)**Applicant:** CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)**Classification:**

- International: A61K38/00; A61K47/48; A61P25/00; A61P43/00;
C07K14/00; C07K14/435; C07K14/475; C07K19/00;
C12N5/00; C12N15/09; C12N15/12; C12P21/02;
C12R1/19; A61K38/00; A61K47/48; A61P25/00;
A61P43/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K19/00;
C12N5/00; C12N15/09; C12N15/12; C12P21/02; (IPC1-
7): C07K7/10; A61K37/02

- European: A61K47/48R; C07K14/435A4D1; C07K14/475

Application number: FR19900006912 19900605**Priority number(s):** FR19900006912 19900605**Also published as:**

WO9118981 (A3)

WO9118981 (A2)

EP0485578 (A3)

EP0485578 (A2)

IE911914 (A1)

more >>

Report a data error here**Abstract of FR2662698**

New class of cellular growth factors which are active in particular on nerve cells, the said factors comprising at least one homeobox peptide, optionally linked to another peptide sequence.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 662 698**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **90 06912**

⑬ Int Cl⁵ : C 07 K 7/10; A 61 K 37/02

⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 05.06.90.

⑯ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS — FR.*

⑱ Inventeur(s) : Joliot Alain et Prochiantz Alain.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 06.12.91 Bulletin 91/49.

⑳ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

㉑ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire : Cabinet Ores.

㉔ Nouveaux facteurs de croissance neurotropes comprenant un peptide homéoboite.

㉕ Nouvelle classe de facteurs de croissance cellulaires,
actifs en particulier sur les cellules nerveuses, lesdits fac-
teurs comprenant au moins un peptide homéoboite, éven-
tuellement lié à une autre séquence peptidique.

FR 2 662 698 - A1



La présente Invention est relative à une nouvelle classe de facteurs de croissance cellulaires, actifs en particulier sur les cellules nerveuses.

On connaît actuellement un petit nombre de facteurs de croissance actifs sur la survie et la différenciation des neurones ; le premier qui a été mis en évidence est le Nerve Growth Factor (NGF). L'action du NGF s'exerce essentiellement sur les neurones sensoriels et les neurones du système nerveux sympathique ; une action sur certaines cellules du système nerveux central et du système immunitaire a également été mise en évidence. L'activité neurotrophique du NGF est portée par une sous-unité (sous-unité β) de 118 acides aminés.

D'autres substances à action neurotrope ont également été décrites : ce sont, par exemple, le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) [LIN et al, SCIENCE, 246, 1023-1026, (1989) ; STOCKLI et al. NATURE, 342, 920-923, (1989)], le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [LEIBROCK et al., NATURE, 341, 149-152, (1989)] , le Glial Derived Nexin (GDN), composant de la matrice extra-cellulaire [GLOOR et al., CELL, 47, 687-693, (1986)],.

Des facteurs de croissance plus ubiquitaires comme le Fibroblast Growth Factor (FGF) [PARK et HOLLENBERG, DEV. BIOL., 134, 201-205, (1989)] ou l'Epidermal Growth Factor (EGF) [MORRISON et al., SCIENCE, 238, 72-74, (1987)] ont également une action neurotrope.

Le mécanisme d'action de ces facteurs est actuellement mal connu. Il a été montré que le NGF pénètre dans les neurones par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, qui est une glycoprotéine phosphorylée [CHAO et al, Science, 232, 518 (1986)]. A l'intérieur de la cellule nerveuse, le NGF stimule la synthèse d'ARN, par l'intermédiaire d'un second messenger. Par exemple, une augmentation de la transcription du complexe AP1 a

été observée sur des cellules du phéocytocrome PC12 stimulées par le NGF [GREENBERG et al., J. BIOL. CHEM., 260, 14101-14110, (1985)].

De nombreuses expérimentations montrent
5 l'intérêt thérapeutique potentiel des facteurs de croissance neurotropes.

L'utilisation du NGF a par exemple été suggérée dans la maladie d'Alzheimer. Il a, en effet, été montré que le NGF permet d'augmenter l'activité choline
10 acétyltransférase des neurones cholinergiques, ainsi que de prévenir leur dégénérescence [MOBLEY et al, Science, 229, 284 (1984)], [KROMER, Science, 235, 214, (1987)]. Or il est connu que la maladie d'Alzheimer est associée à une dégénérescence des neurones cholinergiques et à une
15 diminution de l'activité choline acétyltransférase.

Des expérimentations réalisées sur des rats adultes chez lesquels la voie cholinergique reliant hippocampe et septum avait été au préalable détruite (ce qui entraîne une dégénérescence des neurones septaux),
20 ont montré que l'injection intra-ventriculaire de NGF permet la survie des neurones septaux ainsi que la restauration d'une activité normale choline acétyltransférase [WILL et HEFTI, Behav, Brain. Res., 17,17 (1985)]. L'utilisation des facteurs de croissance neuro-
25 tropes a également été envisagée dans le cas de la maladie de Parkinson, liée à une dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Une autre approche du traitement des maladies associées à une dégénérescence neuronale a été récemment
30 proposée et semble promise, dans un proche avenir, à un développement important : il s'agit des greffes intracérébrales de cellules pouvant suppléer aux fonctions neuronales déficientes; l'utilisation de neurones foetaux [LINDVALL et al., SCIENCE, 247, 574-577, (1990)] ou de
35 lignées cellulaires transformées [HORELLOU et al., EUR. J. NEUROSCI., 2, 116-119, (1990)] a ainsi été suggérée.

Récemment des cellules transformées produisant un NGF recombinant ont été implantées dans le cerveau de rats, en même temps que des neurones cholinergiques d'origine foetale. Il a été constaté que, dans ces conditions, la survie des neurones greffés, ainsi que la néogénèse de fibres nerveuses étaient considérablement augmentées [ERNFORS et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4756, (1989)].

Ces travaux montrent donc que les facteurs de croissance neurotropes peuvent trouver des applications particulièrement intéressantes dans le traitement des troubles résultant de lésions ou de dégénérescence neuronale.

Une restriction à l'utilisation des facteurs de croissance neurotropes est toutefois constituée par le petit nombre de facteurs de croissance actuellement connus, ainsi que par leur spécificité d'action relativement étroite, limitée à certains types de neurones. En outre, la plupart de ces facteurs de croissance ne peuvent pas, actuellement, être obtenus en quantité suffisante pour une utilisation thérapeutique.

Il serait donc particulièrement souhaitable de disposer de facteurs de croissances neurotropes qui ne présentent pas les inconvénients qui viennent d'être mentionnés.

D'autre part, et dans un tout autre domaine, on connaît des gènes qui s'expriment à différents stades du développement embryonnaire, et dont l'expression contrôle les phénomènes de migration et différenciation cellulaires impliqués dans la morphogénèse de l'organisme.

Ces gènes sont appelés gènes homéotiques et leurs produits de traduction sont appelés homéoprotéines.

L'un de ces gènes qui a été tout particulièrement étudié, est le gène Antennapedia de la Drosophile ; l'analyse de ce gène a permis de mettre en évidence une

séquence d'ADN d'environ 180 pb, baptisée séquence homéoboîte.

Cette séquence homéoboîte présente la particularité d'être hautement conservée dans de nombreux gènes homéotiques, et ce, non seulement chez la drosophile, mais également au cours de l'évolution, chez différentes espèces animales. Des séquences homéoboîtes homologues de celle de la Drosophile ont ainsi été trouvées chez tous les vertébrés, y compris les mammifères [ACAMPORA et al.,
 10 NUCLEIC ACID RES., 17, 10385, (1989)].

La séquence homéoboîte code pour une séquence polypeptidique de 60 aminoacides, qui correspond à une région structurellement et fonctionnellement conservée présente dans toutes les homéoprotéines, l'homéodomaine.
 15 La séquence de l'homéodomaine codé par la séquence homéoboîte du gène Antennapedia est indiquée ci-après à titre d'exemple.

(I)

NH₂Arg Lys Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr
 20 Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
 Arg Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr
 Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys
 Trp Lys Lys Glu AsnCOOH.

Le rôle et le mécanisme d'action de la
 25 séquence homéodomaine ont fait l'objet de diverses recherches. On sait ainsi actuellement que cette séquence permet la fixation des homéoprotéines à l'ADN, au niveau de séquences consensus incluant le motif ATTA, présentes dans les promoteurs ou les séquences d'amplification de
 30 différents gènes, y compris les gènes à homéoboîte eux-mêmes.

MULLER et al [EMBO J., 7, 4299, (1988)] ont cloné la séquence homéoboîte d'Antennapedia, et purifié le polypeptide correspondant, ou peptide homéoboîte
 35 (pAntp). En présence d'un agent réducteur, ils sont obtenu le polypeptide sous forme d'un monomère, de coef-

ficient de sédimentation d'environ 1 S, et de poids moléculaire apparent 9040 Da (Poids moléculaire théorique, d'après la séquence peptidique = 8545 Da).

En l'absence d'agent réducteur, la préparation
5 de polypeptide contenait une importante proportion de dimères, correspondant à des homéodomains liés entre eux par des ponts disulfure

Ces mêmes auteurs ont également montré que le polypeptide purifié sous forme monomérique se liait à
10 l'ADN, au niveau d'une séquence ANNNNCATTA, contenant donc la séquence consensus ATTA.

D'autres travaux [OTTING et al, EMBO J., 7, 4305, (1988)] ont établi que l'homéodomaine possédait une structure particulière (hélice/tour β /hélice), qui serait
15 impliquée dans la liaison à l'ADN.

Etant donné le très haut degré de conservation des séquences homéoboîtes d'une espèce à une autre, il est considéré que les propriétés du peptide pAntp peuvent être généralisées aux autres peptides homéoboîte de la
20 même famille, pouvant différer dans leur séquence par quelques acides aminés, mais dotés de propriétés fonctionnelles quasi-identiques ; dans ce qui suit, le terme "peptide homéoboîte" désignera indifféremment aussi bien le peptide pAntp que tout autre membre de ladite famille,
25 ou d'une famille proche, par exemple la famille "engrailed".

Bien que l'on dispose maintenant de nombreuses données, obtenues essentiellement in vitro et en système acellulaire, sur la liaison peptide homéoboîte/ADN, on
30 ignorait jusqu'à présent quelles en étaient les conséquences sur les fonctions cellulaires. On ignorait même si les peptides homéoboîte étaient susceptibles de posséder une activité propre, ou si leur rôle se bornait simplement à permettre la liaison homéoprotéine/ADN.

35 En étudiant l'action de peptides homéoboîte synthétiques sur des cultures cellulaires, les Inventeurs

ont découvert des propriétés surprenantes desdits peptides, propriétés qui n'avaient jamais été soupçonnées jusqu'alors, et qui permettent de considérer ces peptides comme une nouvelle classe de facteurs de croissance.

5 La présente invention a pour objet un facteur de croissance cellulaire, actif sur les neurones, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide homéoboîte.

Au sens de la présente Invention, on entend par peptide homéoboîte, tout peptide appartenant aux familles définies plus haut, et en particulier toute séquence d'acides aminés présentant une homologie d'au moins 70 % avec le peptide pAntp de la Drosophile.

15 La présente Invention englobe également des facteurs de croissance cellulaire résultant de la fusion d'un peptide homéoboîte avec une ou plusieurs autres séquences peptidiques.

Selon un mode de réalisation préféré du facteur de croissance cellulaire conforme à l'Invention, il comprend la séquence peptidique suivante :

20 NH₂Arg Lys Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr
Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
Arg Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr
Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys
Trp Lys Lys Glu AsnCOOH

25 Les Inventeurs ont constaté que les peptides homéoboîtes synthétiques, lorsqu'ils étaient additionnés à des cellules nerveuses en culture, pénétraient dans toutes les cellules nerveuses de la culture et que l'entrée des peptides dans les neurones est suivie d'une
30 accumulation dans le noyau. Cette accumulation est bloquée par préincubation avec un oligonucléotide contenant la séquence consensus ATTA.

Les facteurs de croissance conformes à l'Invention reconnaissent in vitro l'oligonucléotide
35 correspondant à la région du promoteur de Hox 1.3 contenant la séquence consensus ATTA. La préincubation du

peptide avec ledit oligonucléotide inhibe son effet biologique.

Les facteurs de croissance conformes à l'Invention peuvent être facilement obtenus par des procédés connus en eux-mêmes, par exemple par synthèse peptidique, ou bien par génie génétique.

Contrairement aux facteurs de croissance neurotropes connus dans l'art antérieur, les facteurs de croissance conformes à l'Invention sont actifs sur un grand nombre de types de neurones. Les Inventeurs ont en particulier observé l'activité du pAntp sur des cellules nerveuses préparées à partir de diverses régions du système nerveux central embryonnaire, en particulier la corde spinale, le rhombencéphale, le mésencéphale ventral, le tectum et le cortex. L'activité sur les cellules corticales est particulièrement surprenante, car pratiquement aucune expression des homéoprotéines n'a été décelée dans cette région du cerveau.

Le large spectre d'action des peptides homéoboîte en fait des agents pharmacologiques d'un grand intérêt, particulièrement dans le traitement des lésions ou dégénérescences neuronales. Ils peuvent également être utilisés dans le domaine des greffes intracérébrales de neurones, qui sont appelées à se développer et pour lesquelles il est indispensable d'assurer la survie ainsi que le développement le plus rapide et le plus étendu en volume du greffon cellulaire.

Ceci peut être réalisé, par exemple, en préincubant les neurones à greffer avec un facteur de croissance conforme à l'Invention, ou bien en réalisant une greffe conjointe des cellules embryonnaires avec des cellules transformées, capable de synthétiser et de sécréter les peptides homéoboîte, ou des peptides de fusion contenant une séquence homéoboîte.

La présente Invention a pour objet une composition comprenant au moins un peptide homéoboîte, éven-

tuellement lié à une autre séquence peptidique, pour l'utilisation comme médicament, et plus particulièrement comme médicament destiné au traitement des dégénérescences neuronales.

5 La présente Invention a également pour objet l'utilisation d'un peptide homéoboîte, ou d'une composition comprenant un peptide homéoboîte, lequel peptide est éventuellement lié à une autre séquence peptidique, comme facteur de croissance de neurones en culture.

10 La présente Invention a également pour objet un procédé de traitement in vitro de neurones destinés à la greffe, lequel procédé est caractérisé en ce que lesdits neurones sont incubés en présence d'au moins un peptide homéoboîte, éventuellement lié à une autre
15 séquence peptidique.

La présente Invention a en outre pour objet une composition cellulaire utilisable dans les techniques de greffe de neurones, laquelle composition est caractérisée en ce qu'elle contient une association des neurones
20 que l'on souhaite greffer et de cellules transformées aptes à synthétiser et sécréter un peptide homéoboîte.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples démontrant l'activité des facteurs
25 de croissance conformes à l'Invention.

Il va de soi toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

30 **I) OBTENTION DE FACTEURS DE CROISSANCE CONFORMES A L'INVENTION.**

EXEMPLE I : Obtention d'un peptide pAntp

La séquence codant pour l'homéodomaine du gène Antennapedia de la drosophile a été synthétisée en utilisant la technique de la PCR, à partir du plasmide p903G
35 qui contient, entre ses sites BamH1 et PVUII, un fragment

de 600bp d'ADNc de l'Antp (GARBER et al., 1983). Les deux amorces dont la séquence est indiquée ci-dessous sont utilisées. La première amorce :

(5'GGGGAATTCCATATGCGCAAACGCGCAAG 3')

- 5 contient un site de restriction NdeI en amont du codon d'initiation, et la deuxième amorce :

(5'GGGGAAGCTTGGATCCTCAGTTCTCCTTCTTCCACTTCAT 3')

- contient un codon de terminaison suivi par un site BamHI. Un plasmide, dénommé pAH1 a été formé par ligation du
 10 fragment NdeI-BamHI de 220 bp obtenu par PCR, au plasmide pET3a (ROSENBERG et al., 1987). Le polypeptide a ensuite été exprimé dans *E. Coli* BL 21 (Lys S). Les cellules transformées ont été cultivées à 37 °C dans du milieu LB en présence d'ampicilline et de chloramphénicol (100 µg
 15 chacun), jusqu'à une densité optique $DO_{600} = 1,2$. Après une induction de 5 heures en présence de 1 mM d'IPTG, les cellules ont été recueillies par centrifugation (16000 g, 15 min), lavées trois fois au tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, DTT 1 mM
 20 (tampon A) puis soniquées.

- Après centrifugation (16000 g, 15 min) le surnageant a été précipité avec du sulfate de streptomycine (20 mg/ml) sous agitation douce pendant 15 minutes à température de la pièce, puis centrifugé (16000 g, 15 min).
 25 Le surnageant a été directement chargé sur une colonne S-SEPHAROSE Fast Flow (PHARMACIA), au préalable équilibrée avec le tampon A. La colonne a été ensuite lavée avec une grande quantité de tampon phosphate 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M et le peptide pAntp a été élué par application d'un
 30 gradient de NaCl (0,5 à 1 M). Le peptide élué (3 mg/l de culture) a été ensuite dialysé pendant 24 heures contre du tampon phosphate 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM.

- Les séquences du segment d'ADN amplifié et du peptide ont été déterminées (APPLIED BIOSYSTEM 477) et il
 35 a été vérifié qu'elles correspondaient à celles de l'homéoboîte d'Antennapedia. L'analyse du peptide par

électrophorèse sur gel en présence de SDS a démontré la présence d'une seule bande du poids moléculaire correspondant à celui de l'homéopeptide d'Antennapedia.

La séquence du peptide obtenu est la
5 suivante :

(I)

NH₂Arg Lys Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr
Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
Arg Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr
10 Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys
Trp Lys Lys Glu AsnCOOH

Il a en outre été vérifié, par retardement sur gel du peptide préincubé avec un duplex oligonucléotidique correspondant au site de liaison d'une protéine
15 homéoboîte du type Antennapedia, et obtenu à partir du promoteur Hox1.3 [Hox1.3p, (ODENWALD et al., GENES AND DEV., 3, 158, 1989)] :

3' CAGAGCACGTGATTACCCCTCAACC 5'

5' GTCTCGTGCACTAATGGGGGAGTTGG 3'

20 que le peptide reconnaît in vitro la séquence consensus de fixation des protéines de type Antennapedia.

II) DEMONSTRATION DE L'ACTIVITE DES FACTEURS DE CROISSANCE CONFORMES A L'INVENTION

Exemple 2 : Démonstration de l'effet
25 biologique du peptide pAntp

Les neurones prélevés dans différentes régions du cerveau (mésencéphale , corde spinale, cortex) d'embryons (E14 à E16) de rat sont mis en culture dans un milieu défini (CHAMAK and PROCHIANTZ, DEVELOPMENT, 106,
30 483, 1989) permettant la survie des seules cellules neuronales.

Le peptide pAntp est renaturé par une incubation de 10 min à 60 °C en présence de dithiothréitol (0,1 mM) et de Magnésium (10 mM) dans un tampon phosphate
35 pH 7,2 isotonique contenant 33 mM de D-Glucose. Le pep-

tide est rajouté aux cellules nerveuses à une concentration de 9 µg/ml (soit 1,3 µM).

Les effets observés à des temps variables après l'addition du peptide sont illustrés dans la figure 1 (A et B). La figure 1A montre l'aspect de cellules témoins cultivées pendant 24 heures en l'absence du peptide. La figure 1B montre l'aspect des cellules cultivées pendant 24 heures en présence du peptide. On note, dès 24h après l'addition, une considérable augmentation de la croissance neuritique dans les cellules cultivées en présence du peptide pAntp.

Il a également été montré que la préincubation du peptide avec la séquence consensus de fixation obtenue à partir du promoteur Hox1.3 et mentionnée plus haut, bloque son effet biologique

Il a en outre été montré, en utilisant un peptide marqué à la fluorescéine, que le peptide est rapidement (moins de 2 heures) capturé par tous les neurones, puis transporté dans le noyau (figure 2A), et que ce transport est bloqué après préincubation avec l'oligonucléotide consensus obtenu à partir du promoteur Hox1.3 (Figure 2B).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, la présente invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1) Facteur de croissance cellulaire, en particulier neurotrope, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un peptide homéoboîte, éventuellement lié à une
5 autre séquence peptidique.

2) Facteur de croissance cellulaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique suivante :

(I)

10 NH₂Arg Lys Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr
Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr
Arg Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr
Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys
Trp Lys Lys Glu AsnCOOH

15 3) Composition comprenant au moins un peptide homéoboîte, éventuellement lié à une autre séquence peptidique, pour l'utilisation comme médicament, en particulier comme médicament destiné au traitement des dégénérescences neuronales.

20 4) Utilisation d'un peptide homéoboîte, ou d'une composition comprenant au moins un peptide homéoboîte, lequel peptide est éventuellement lié à une autre séquence peptidique, comme facteur de croissance de neurones en culture.

25 5) Procédé de traitement in vitro de neurones destinés à la greffe, lequel procédé est caractérisé en ce que lesdits neurones sont incubés en présence d'au moins un peptide homéoboîte, éventuellement lié à une autre séquence peptidique.

30 6) Composition cellulaire utilisable dans les techniques de greffe de neurones, laquelle composition est caractérisée en ce qu'elle contient une association des neurones que l'on souhaite greffer, et de cellules transformées aptes à synthétiser et sécréter un peptide
35 homéoboîte ou un peptide de fusion comprenant une séquence homéoboîte.

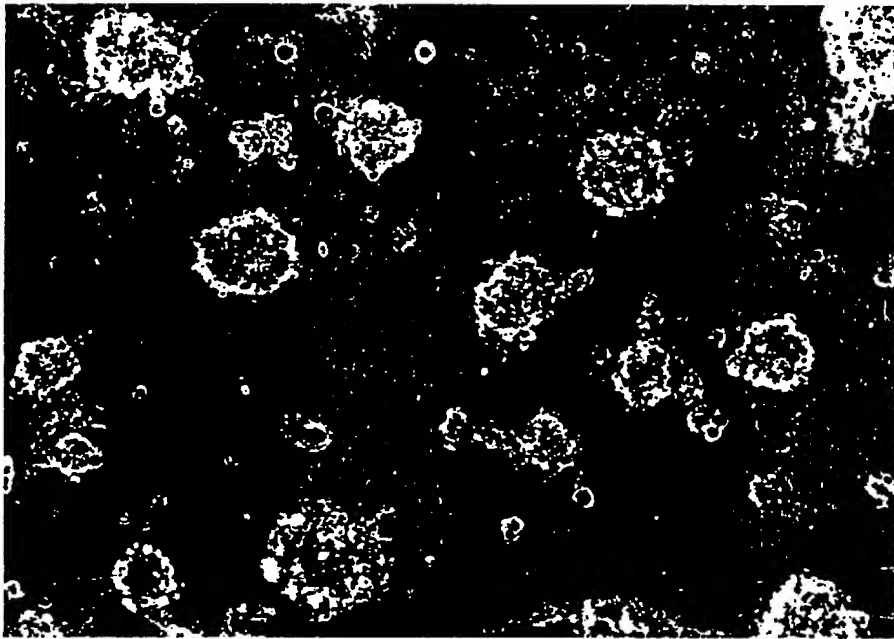


Figure IA

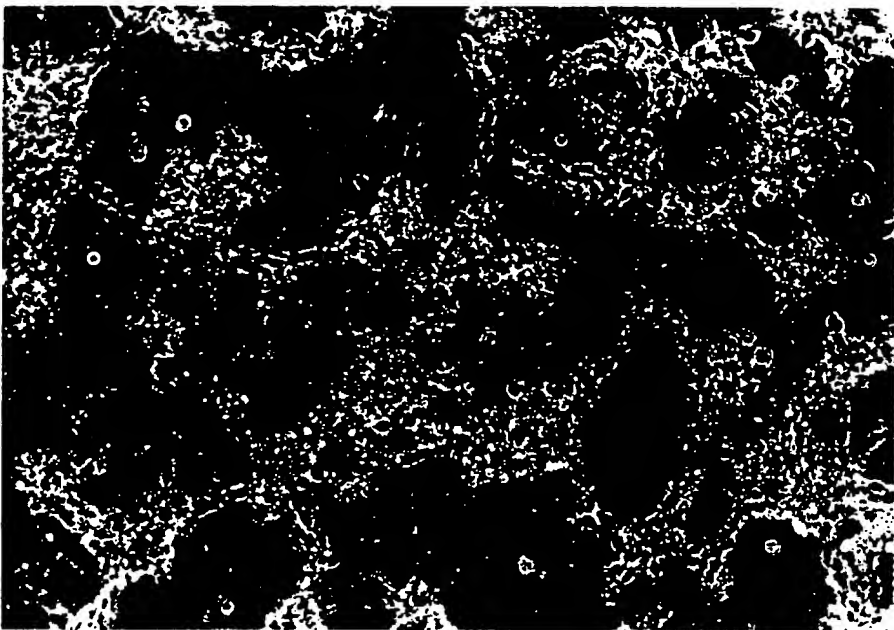


Figure IB

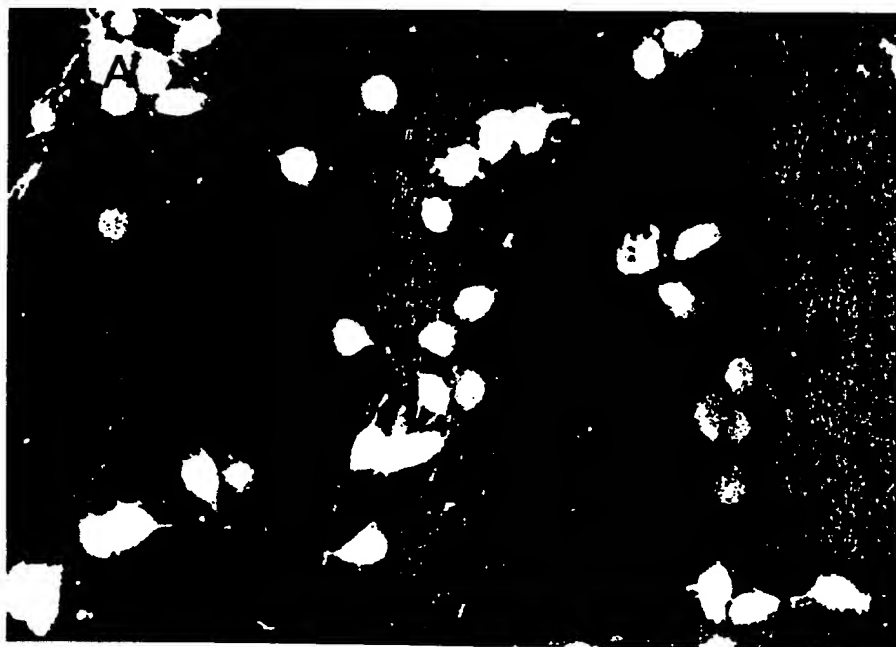


Figure IIA

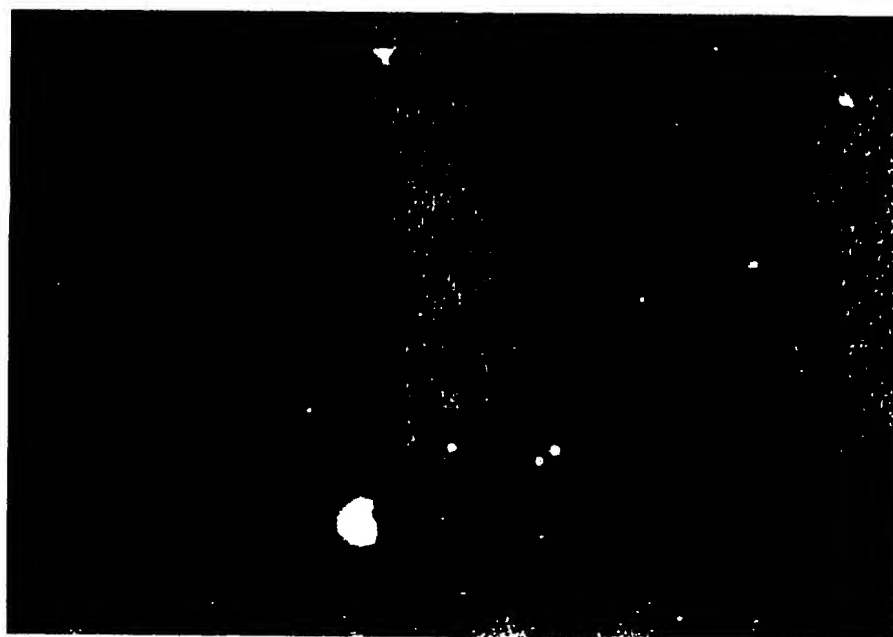


Figure IIB

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9006912
FA 443360

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	BIO ESSAYS, vol. 10, nos. 2,3, février-mars 1989, pages 82-85; D.G. WILKINSON: "Homeobox genes and development of the vertebrate CNS" * En entier *	1
Y	IDEM	1-6
Y	MOL. CELL. BIOL., vol. 6, no. 12, décembre 1986, pages 4676-4689; A. LAUGHON et al.: "Structure of transcripts from the homeotic antennapedia gene of Drosophila melanogaster: Two promoters control the major protein-coding region" * En entier, en particulier figure 8 *	1-6
D,Y	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 86, juin 1989, pages 4756-4760; P. ERNFORS et al.: "A cell line producing recombinant nerve growth factor evokes growth responses in intrinsic and grafted central cholinergic neurons" * En entier *	5,6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C 07 K A 61 K
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, 1989, pages 10385-10402; D. ACAMPORA et al.: "The human HOX gene family"	
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
25-01-1991		NOVOA Y SANJURJO M.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		